

Получение мутаций в генах *l14* и *rsfS* у *Staphylococcus aureus* для анализа роли аминокислотных остатков в формировании гетеродимера L14/RsfS.

Научный руководитель – Валидов Шамиль Завдатович

Валиахметов Эмиль Эльмирович

Студент (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия

E-mail: emlvaliakmetov@gmail.com

Рибосома - центральный элемент белкового синтеза, для сборки которой необходимо более сотни белков и 3 (4) молекулы рРНК. В состоянии покоя бактериальной клетке необходимо снизить интенсивность синтеза белка, что достигается, в том числе, и путем инактивации сборки рибосом. В таком случае их функциональность теряется лишь временно [2]. У всех эубактерий обнаружен белок RsfS (ribosome silencing factor) фактор сайленсинга рибосомы. Взаимодействуя с белком L14, он связывается с 50S субъединицей рибосомы и препятствует ее взаимодействию с 30S субъединицей, что предотвращает сборку 70S рибосомы [1]. Целью данной работы было получение мутантных белков *Staphylococcus aureus* L14 и RsfS для анализа роли аминокислотных остатков в формировании гетеродимера.

Структуры белков RsfS и L14 были подробно проанализированы, что позволило установить аминокислоты, участвующие в формировании связи в гетеродимере. Для замены установленных аминокислот был произведен сайт-направленный мутагенез, включающий в себя разработку праймеров и ПЦР. Последовательность мутантных генов была секвенирована для подтверждения наличия мутаций. Для выделения и очистки белкового комплекса L14-his/RsfS провели трансформацию мутантных плазмид в штамм *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Клетки выращивали на питательной среде, затем индуцировали экспрессию с помощью ИПТГ, после чего клетки собирали и лизировали. Из полученного лизата выделяли комплекс L14-his/RsfS методом афинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA. Поскольку в гетеродимере только белок L14 содержит гистидиновый таг, выделение второго белка RsfS зависит от эффективности формирования димера. Таким образом, анализ выделенных белков с помощью денситометрии позволяет судить об изменении прочности связи между белками L14-his/RsfS с аминокислотными заменами. Относительное увеличение белка L14-his говорит об ослаблении связи между белками, что приводит к менее эффективному выделению RsfS. Результаты очистки исходных и мутантных белков показаны на Рисунке 1. В дорожках 2-9 наблюдается изменение соотношения L14-his/RsfS относительно дикого типа, что показывает влияние аминокислотных замен на взаимодействие двух белков.

Таким образом, можно утверждать, что мутации E70A Y98A, R107A, L117E, R97A, K113A, W77E (в порядке убывания) действительно оказывают негативное влияние на прочность связи белков в гетеродимере L14/RsfS, при этом замены заряженных аминокислот Glu70, Arg97 и ароматической Tyr98 являются наиболее критичными для димеризации.

Источники и литература

- 1) X. Li, Q. Sun, , C. Jiang, K. Yang, L.W. Hung, J. Zhang, J.C. Sacchettini. Structure of Ribosomal Silencing Factor Bound to Mycobacterium tuberculosis // Ribosome. Structure. 2015; 23: 2387-2405.

- 2) T. Prossliner, K. Skovbo, Winther, M.A. Sorensen, K. Gerdes. Ribosome Hibernation. // Annu Rev Genet 2018; 52: 321-348.

Иллюстрации

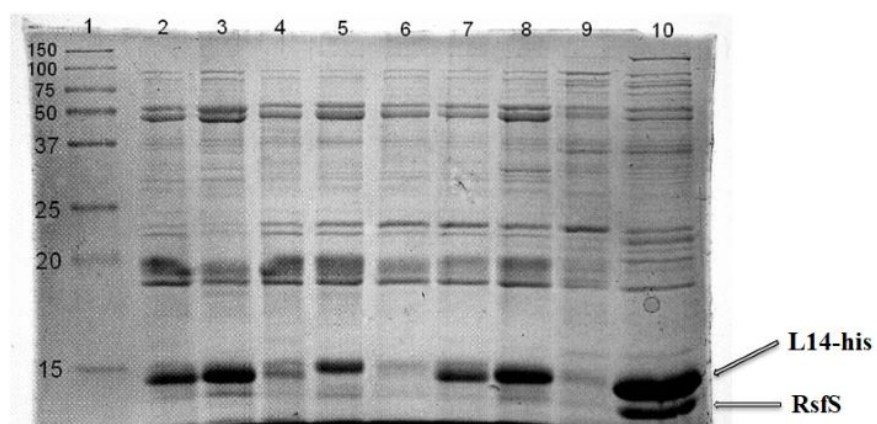


Рис. 1. Результат электрофореза белков в ПААГ после выделения на сорбенте Ni-NTA. Дорожка 1 – Маркер, 2 – R97A, 3 – R107A, 4 – K113A, 5 – L117E, 6 – D81A, 7 – E70A, 8 – Y98A, 9 – W77E, 10 – Дикий тип.